



#18

PCT

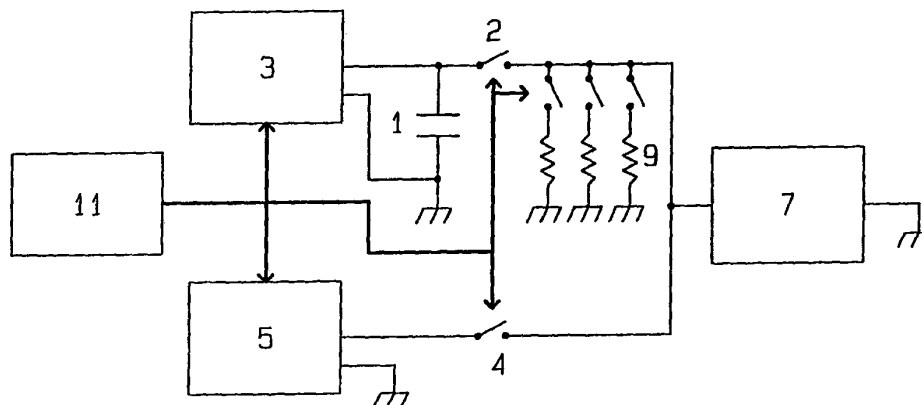
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :<br><b>C12N 15/87, 13/00</b>   |  | A1  | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 91/18103</b><br>(43) Date de publication internationale: 28 novembre 1991 (28.11.91) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE91/00030<br>(22) Date de dépôt international: 16 mai 1991 (16.05.91)<br>(30) Données relatives à la priorité:<br>9000518 16 mai 1990 (16.05.90) BE<br>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SCIENTIFIC EQUIPMENT DESIGN & DEVELOPMENT S.C. [BE/BE]; 28, rue de l'Ancienne-Ecole, B-4030 Grivegnée (BE).<br>(72) Inventeurs; et<br>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SERVAIS, Christian [BE/BE]; 31, rue de la Casmaterie, B-4051 Chaudfontaine (BE). LOUETTE, Joël [BE/BE]; 28, rue de l'Ancienne-Ecole, B-4030 Grivegnée (BE). |  | (74) Mandataire: VAN MALDEREN, Michel; Office Van Malderen, 85/043, boulevard de la Sauvenière, B-4000 Liège (BE).<br>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BB, BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BG, BJ (brevet OAPI), BR, CA, CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH (brevet européen), CI (brevet OAPI), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), GR (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KP, KR, LK, LU (brevet européen), MC, MG, ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), MW, NL (brevet européen), NO, PL, RO, SD, SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), SU, TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US.<br><br>Publiée<br>Avec rapport de recherche internationale.<br>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues. |   |

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR MAKING LIVING CELLS PERMEABLE

(54) Titre: PROCÉDE ET DISPOSITIF DE PERMEABILISATION DE CELLULES VIVANTES



(57) Abstract

A method and a device for making cell membranes permeable using electrical discharges (electroporation), wherein at least one short electrical discharge is applied to a suspension containing cells to be made permeable and molecules to be accommodated therein, in order to generate in said suspension a high-value electric field, whereafter at least one longer electrical discharge is applied thereto to generate a lower-value electric field therein.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé et dispositif de perméabilisation de membranes cellulaires par décharge électrique (électroporation) dans lequel on applique à une suspension contenant des cellules à rendre perméables, ainsi que des molécules destinées à être logées à l'intérieur des cellules, successivement, au moins une décharge électrique de courte durée engendrant dans la suspension un champ électrique de valeur élevée et ensuite au moins une décharge électrique de plus longue durée et engendrant dans la suspension un champ électrique de valeur moins élevée.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|-----------------------|
| AT | Autriche                  | ES | Espagne                                       | MG | Madagascar            |
| AU | Australie                 | FI | Finlande                                      | ML | Mali                  |
| BB | Barbade                   | FR | France  | MN | Mongolie              |
| BE | Belgique                  | GA | Gabon   | MR | Mauritanie            |
| BF | Burkina Faso              | GB | Royaume-Uni                                   | MW | Malawi                |
| BG | Bulgarie                  | GN | Guinée  | NL | Pays-Bas              |
| BJ | Bénin                     | GR | Grèce   | NO | Norvège               |
| BR | Brésil                    | HU | Hongrie                                       | PL | Pologne               |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | RO | Roumanie              |
| CF | République Centrafricaine | JP | Japon   | SD | Soudan                |
| CG | Congo                     | KP | République populaire démocratique<br>de Corée | SE | Suède                 |
| CH | Suisse                    | KR | République de Corée                           | SN | Sénégal               |
| CI | Côte d'Ivoire             | LI | Liechtenstein                                 | SU | Union soviétique      |
| CM | Cameroun                  | LK | Sri Lanka                                     | TD | Tchad                 |
| CS | Tchécoslovaquie           | LU | Luxembourg                                    | TG | Togo                  |
| DE | Allemagne                 | MC | Monaco  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark                  |    |   |    |                       |

5

10     PROCÉDÉ ET DISPOSITIF DE PERMÉABILISATION DE CELLULES  
          VIVANTES

Objet de l'invention

          Le transfert de matériel génétique nouveau ainsi  
          que de protéines étrangères ou autres molécules ou macro-  
15    molécules dans des cellules vivantes a gagné en importance  
          depuis les derniers développements en biochimie et notamment  
          en génétique.

          La présente invention est relative à ce domaine et  
          concerne plus particulièrement un procédé de perméabilisation  
20    des membranes de cellules vivantes ainsi qu'un dispositif  
          pour la mise en oeuvre de ce procédé.

Etat de la technique

          Parmi les différentes méthodes destinées à rendre  
          les membranes cellulaires perméables, de façon à permettre  
25    l'introduction de "corps étrangers" on connaît notamment les  
          techniques de perméabilisation par chocs électriques, couram-  
          ment dénommées "électroporation".

          L'article "Transformation of bacteria by electro-  
          poration" de B.M. Chassy et al., Trends in Biotechnology,  
30    vol. 6, n° 12, décembre 1988, pages 303-309 décrit les prin-  
          cipes de base utilisés dans les méthodes classiques d'élec-  
          troporation: il mentionne des expériences de transformation  
          par électroporation qui ont été réalisées antérieurement sur  
          des cellules eucaryotiques et procaryotiques.

35        On utilise habituellement une impulsion ou une  
          série d'impulsions identiques, le plus souvent de haut vol-  
          tage (en règle générale, des impulsions générant un champ  
          électrique de 2 à 12 kV/cm). Les décharges appliquées aux

cellules sont soit une décharge unique, soit un train d'ondes identiques de type exponentiel décroissant ou carré par exemple.

Une illustration d'une technique d'électroporation de ce type, appliquée à des cellules eucaryotiques est donnée dans l'article "Enhancer-dependent expression of human immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation" de H. POTTER et al., Proc. Natl. Acad. Sci - USA, Vol. 81, pages 7161-7165, Novembre 1984, qui décrit une méthode dans laquelle l'application d'un choc électrique de 2 à 4 kV dans une suspension contenant de l'ADN cloné dans un vecteur plasmidien et des cellules murines a permis d'obtenir la transfection de gènes dans ces cellules.

Par l'article "Electric shock-mediated transfection of cells", Biochem. J. (1988) 251, 427-434, de David J. Winterbourne et al., il est connu d'appliquer des impulsions de durée variable à une solution contenant les cellules à percer ainsi que de l'ADN à faire pénétrer dans lesdites cellules.

On y mentionne notamment des impulsions du type rectangulaire créant un champ électrique de l'ordre de 2,5 à 3 kV/cm. Il y a également été montré une corrélation entre la durée des impulsions et l'efficacité de l'opération.

Toutefois, l'application d'un champ électrique entraîne une dissipation d'énergie importante dans la solution qui a pour résultat une mortalité élevée des cellules.

L'article "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation", Nucleic Acids Research (1988), volume 16, n° 13, 6127-6144, de William J. Dower et al. et le brevet US-A-4 910 140 mentionnent des essais faisant appel à une électroporation à l'aide d'impulsions de courte durée. On y atteint des résultats satisfaisants avec des champs électriques allant jusqu'à 12,5 kV/cm et 16,7 kV/cm et une corrélation entre la valeur du champ électrique et la durée des impulsions est également établie.

Bien que l'énergie dissipée dans la solution soit réduite, l'efficacité de l'opération est limitée par une mortalité des cellules due à l'éclatement suite à des chocs

électriques trop importants.

Le brevet US-A-4 663 292 (WONG et al.) décrit un système apte à fournir des trains d'impulsions carrées de haut voltage et de courte durée, identiques, et à les appliquer à une suspension contenant des cellules et des macromolécules biologiques telles que des gènes. Le cas échéant, l'application du train de décharges est précédée par l'application à la suspension d'un champ électrique non uniforme de haute fréquence, non assimilable à un train d'impulsions et connue en soi par ailleurs. Il n'y a pas de contact direct entre l'électrode de décharge et la suspension, selon la technique décrite dans ce document.

#### But de l'invention

La présente invention vise à fournir un procédé de perméabilisation des membranes cellulaires qui ne présente pas les inconvénients de l'état de la technique et qui permet d'améliorer le rendement des manipulations en augmentant le taux de cellules percées et/ou la survie des cellules et/ou l'entrée des molécules étrangères dans les cellules.

Un autre but de la présente invention consiste à fournir un dispositif permettant la mise en oeuvre du procédé.

#### Éléments essentiels de l'invention

Conformément à la présente invention, on applique à une suspension contenant les cellules à rendre perméables ainsi que les molécules destinées à être logées à l'intérieur des cellules, successivement au moins une décharge électrique de courte durée engendrant dans la suspension un champ électrique de valeur élevée et ensuite au moins une décharge électrique de plus longue durée et engendrant dans la suspension un champ électrique de valeur moins élevée.

On a constaté que cette façon de procéder permet de réduire le taux de mortalité des cellules tout en augmentant le taux de pénétration de celles-ci.

Il est bien entendu que les deux étapes de l'invention doivent se suivre dans un laps de temps très court. En effet, plus le laps de temps séparant les deux étapes est important, plus le taux de mortalité des cellules est élevé

et plus le taux de transformation est faible. On a constaté qu'un temps d'environ 10 secondes constitue un seuil à ne pas dépasser.

Avantageusement, la décharge de courte durée  
5 consiste en une impulsion à décroissance exponentielle, notamment obtenue par la décharge d'un condensateur. Elle peut également consister en une ou plusieurs impulsions du type rectangulaire.

Les valeurs du champ électrique engendré par la  
10 décharge de courte durée peuvent atteindre 400 à 25000 V/cm en fonction de la durée de l'impulsion et du type de cellules à traiter, la durée étant de l'ordre de 10  $\mu$ s à 10 ms.

En règle générale, on sélectionne les caractéristiques de la décharge de courte durée de manière telle que le  
15 champ électrique engendré par celle-ci soit compris:

- entre 400 et 2500 V/cm lorsqu'on traite des cellules eucaryotiques provenant d'organismes pluricellulaires;
- entre 2000 et 5000 V/cm lorsqu'on traite des cellules eucaryotiques unicellulaires telles que des levures, et
- 20 - entre 10000 et 25000 V/cm lorsqu'on traite des cellules procaryotiques.

Par ailleurs, la décharge de longue durée peut  
avantageusement consister en une tension essentiellement  
continue, par exemple fournie par un générateur basse  
25 tension. Le champ électrique engendré peut être de l'ordre de 50 à 1000 V/cm, en fonction de la durée de l'impulsion et du type de cellules à traiter. La tension est généralement appliquée pendant un temps cumulé de l'ordre de 1 ms à 1 s.

Selon une autre variante, l'impulsion de longue  
30 durée est éventuellement une impulsion à décroissance exponentielle.

Selon une forme d'exécution préférée, la première  
décharge et/ou la seconde décharge peuvent consister en un  
train d'ondes. Dans ce cas, on peut encore prévoir de permuter  
35 la polarité de la différence de potentiel aux bornes de la solution au cours de la décharge.

Pour ce qui concerne la décharge de courte durée, un effet de résonance dû à l'inversion de la polarité peut

augmenter la création de pores dans la paroi cellulaire.

D'autre part, l'inversion de polarité lors de la décharge de longue durée peut provoquer des mouvements de va-et-vient de la molécule, par exemple l'ADN, à introduire dans les cellules, ce qui augmente les chances de pénétration dans la cellule.

Le procédé de la présente invention permet de transformer des souches cellulaires que l'on n'était pas encore arrivé à transformer jusqu'à présent. Des expériences sur lymphocytes humains et sur certaines souches de levure ont été particulièrement concluantes.

Dans la mesure où la durée de vie des cellules dans le milieu considéré le permet, on peut encore augmenter le taux de pénétration en effectuant successivement plusieurs démarches conformes à l'invention.

Le dispositif qui permet la mise en oeuvre du procédé de l'invention comporte au moins une source de haute tension et une source de basse tension, la tension dégagée par l'une et l'autre étant alternativement mise aux bornes d'électrodes adaptées à une cuvette connue en soi destinée à contenir la suspension.

La source de haute tension peut avantageusement consister en un condensateur associé à un circuit de charge; il peut également s'agir d'un générateur haute tension.

La source de basse tension quant à elle peut être par exemple un générateur basse tension, ou encore un condensateur associé à un circuit de charge.

D'une manière préférée, la tension et la constante de temps du ou des condensateur(s) sont programmables.

Le procédé ainsi que le dispositif de l'invention conviennent particulièrement bien pour la perméabilisation de parois cellulaires afin d'y introduire des molécules telles que l'ADN, des protéines, des anticorps, des drogues ou autres produits chimiques.

Une autre application réside dans l'extraction de molécules, notamment de l'ADN, de cellules rendues perméables. Cette technique permet notamment d'obtenir de l'ADN "propre", simplifiant grandement les étapes de purification

ultérieure.

On peut encore trouver une application du procédé de l'invention dans la modification de cellules et éventuellement dans la fusion de celles-ci.

5 La figure 1 est une représentation schématique d'une forme d'exécution d'un dispositif permettant la perméabilisation de cellules vivantes selon l'invention. Celui-ci comporte un condensateur 1 associé à un circuit de charge 3. Une fois que ce condensateur 1 est chargé à une valeur pré-

10 déterminée par le circuit de contrôle 11, un dispositif de commutation 2 (de type relais, thyristor, GTO ou assimilé) le met en contact avec une cuvette d'électroporation 7 contenant, en suspension, des cellules vivantes et des macromolécules biologiques. La première décharge est alors appliquée.

15 A la fin de cette décharge, le dispositif 2 passe en position ouverte et un autre dispositif de commutation 4, de même type, met ensuite en contact le générateur basse-tension 5 avec la cuvette d'électroporation. La deuxième décharge peut alors avoir lieu. Ses caractéristiques (forme,

20 amplitude, durée) sont aussi déterminés par le circuit de contrôle 11.

A la fin de la seconde décharge, le dispositif de commutation 4 retourne à l'état ouvert et le dispositif de l'invention est prêt pour une nouvelle électroporation.

25 Un dispositif de shuntage 9 commandé par le circuit de contrôle 11 est placé en parallèle sur la cuvette d'électroporation 7 pour permettre la détermination de la constante de temps de décharge du condensateur 1.

Suivant une autre forme d'exécution non représentée, le dispositif de l'invention ne comporte pas de condensateur, ni de circuit de charge. Dans ce cas, un générateur

30 haute tension génère la première décharge, de courte durée, qui est alors de type rectangulaire. Dans cette forme d'exécution, le dispositif de commutation 2 reste fermé en permanence pendant chaque décharge de type rectangulaire.

35

Eventuellement, la deuxième décharge peut aussi être de type exponentiel décroissant, auquel cas le générateur basse tension sera remplacé par un ensemble circuit de



charge et condensateur, la valeur de charge de ce dernier étant également déterminée par le circuit de contrôle.

Avantageusement, les valeurs des différents paramètres (résistance du dispositif de shuntage, capacité du condensateur, voltage et durée de la décharge émise) sont réglables et programmables.

Le cas échéant, un condensateur peut être remplacé par plusieurs condensateurs de capacités différentes sélectionnées par le circuit de contrôle 11 montés en parallèle.

L'invention est décrite plus en détail ci-dessous à l'aide d'exemples d'exécution de perméabilisation de cellules réalisées grâce à un dispositif selon l'invention..

#### Exemple 1

Perméabilisation de cellules hypophysaires de rat (lignée GH, GC, GH3b6, GH4,...)

On prépare les cellules comme pour une électroporation classique. On les concentre à 4 millions de cellules/800  $\mu$ l, dans le milieu de culture habituel de ces cellules. On ajoute l'ADN, de 3  $\mu$ g à 100  $\mu$ g suivant le plasmide ou le fragment d'ADN utilisé. On dépose 800  $\mu$ l du mélange dans une cuvette d'électroporation classique de 4 mm. On applique une première décharge de 300 V (750 V/cm), avec une résistance de shuntage de 74  $\Omega$  et un condensateur de 40  $\mu$ F. On applique ensuite, une seconde décharge de 100 V (250 V/cm) avec une résistance de shuntage de 132  $\Omega$  et un condensateur de 1800  $\mu$ F. Les cellules sont immédiatement transvasées dans du milieu de culture frais. Par la méthode de mesure enzymatique "CAT", on obtient une réponse 10 à 100 fois supérieure par rapport à l'état de la technique.

#### Exemple 2

##### Perméabilisation de levures

On procède de façon analogue à l'exemple 1 en utilisant les paramètres suivants :

- première décharge: 750 V à 1500 V suivant la souche

shunt 74  $\Omega$

condensateur 40  $\mu$ F

cuvettes de 2 mm

- deuxième décharge: 100 V

shunt 282  $\Omega$

condensateur 1800  $\mu\text{F}$

On obtient  $10^3$  à  $10^7$  transformants/ $\mu\text{g}$  ADN, c'est-à-dire jusqu'à 10 à 100 fois plus que selon l'état de la technique.

### Exemple 3

#### Perméabilisation de bactéries

On procède de manière analogue avec les paramètres suivants:

10 - première décharge: voltage de 2000 à 2500 V

shunt de 74  $\Omega$

condensateur de 40  $\mu\text{F}$

cuvettes de 2 mm

- deuxième décharge: voltage de 100 V

15 shunt de 132  $\Omega$

condensateur de 1800  $\mu\text{F}$

Dans le cas de bactéries gram-, on obtient  $10^6$  à  $10^{11}$  transformants/ $\mu\text{g}$  ADN, c'est-à-dire jusqu'à 10 fois plus que selon l'état de la technique.

20 Dans le cas des bactéries gram +, on obtient  $10^4$  à  $10^7$  transformants/ $\mu\text{g}$  ADN, c'est-à-dire jusqu'à 100 fois plus.

### Exemple 4

#### Perméabilisation de protoplastes

25 On procède de façon analogue aux exemples précédents avec les paramètres suivants:

- première décharge: voltage de 150 à 250 V

shunt de 74  $\Omega$

condensateur de 40  $\mu\text{F}$

30 cuvettes de 4 mm

- deuxième décharge: voltage de 50 à 100 V

shunt de 132  $\Omega$

condensateur de 1800  $\mu\text{F}$

On obtient  $10^3$  à  $10^5$  transformants/ $\mu\text{g}$  ADN.

### REVENDICATIONS

1. Procédé de perméabilisation de membranes cellulaires par décharge électrique (électroporation) caractérisée en ce qu'on applique à une suspension contenant des cellules  
5 à rendre perméables ainsi que des molécules destinées à être logées à l'intérieur des cellules, successivement au moins une décharge électrique de courte durée engendrant dans la suspension un champ électrique de valeur élevée et ensuite au moins une décharge électrique de plus longue durée et  
10 engendrant dans la suspension un champ électrique de valeur moins élevée.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la décharge de courte durée consiste en une impulsion à décroissance exponentielle, notamment obtenue par la dé-  
15 charge d'un condensateur.

3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la décharge de courte durée consiste en une impulsion de type rectangulaire.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendica-  
20 tions précédentes, caractérisé en ce que la valeur du champ électrique engendré par la décharge de courte durée varie de 400 à 25000 V/cm, en fonction de la durée de l'impulsion et du type de cellules à traiter, la durée de l'impulsion étant de 10  $\mu$ s à 10 ms.

25 5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que la valeur du champ électrique engendré par la décharge de courte durée varie de 400 à 2500 V/cm lorsqu'on traite des cellules eucaryotiques provenant d'organismes pluricellulaires, de 2000 à 5000 V/cm lorsqu'on traite des cellules euca-  
30 ryotiques unicellulaires telles que des levures et de 10.000 à 25.000 V/cm lorsqu'on traite des cellules procaryotiques.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendica-  
tions précédentes caractérisé en ce que la seconde décharge, de longue durée, consiste en une tension essentiellement  
35 continue, par exemple fournie par un générateur basse tension, engendrant un champ électrique de l'ordre de 50 à 1000 V/cm, en fonction de la durée de l'impulsion et du type de cellules à traiter.

7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que la tension essentiellement continue est appliquée pendant un temps cumulé de l'ordre de 1 ms à 1 s.

5 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la seconde décharge, de longue durée, consiste en une impulsion à décroissance exponentielle.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la décharge de courte durée  
10 et/ou la décharge de longue durée consistent en un train d'ondes.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 9 caractérisé en ce qu'on permute la polarité de la différence de potentiel aux bornes de la solution  
15 pendant la seconde décharge, de courte durée, et le cas échéant pendant la première décharge.

11. Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention caractérisé en ce qu'il comporte au moins une source de haute tension, et une source de basse tension, la  
20 tension dégagée par l'une et l'autre étant alternativement mise aux bornes d'électrodes adaptées à une cuvette connue en soi destinée à contenir une suspension contenant des cellules à rendre perméables, ainsi que des molécules destinées à être logées à l'intérieur des cellules.

25 12. Dispositif selon la revendication 11 caractérisé en ce que la source de haute tension consiste en un condensateur (1) associé à un circuit de charge (3).

13. Dispositif selon la revendication précédente caractérisé en ce que la source de haute tension consiste en  
30 un générateur haute tension.

14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 13 caractérisé en ce que la source de basse tension consiste en un générateur basse tension (5).

15. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 13 caractérisé en ce que la source de basse  
35 tension consiste en un condensateur associé à un circuit de charge.

16. Dispositif selon l'une quelconque des

revendications 11 à 15 caractérisé en ce que la tension maximum et la constante du temps du ou des condensateur(s) sont programmables.

5 17. Utilisation du dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 16 pour l'introduction dans les cellules de molécules telles que l'ADN, des protéines, des anticorps, des drogues ou autres produits chimiques.

10 18. Utilisation du dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 16 pour l'extraction de molécules, notamment de l'ADN, de cellules.

19. Utilisation du dispositif selon l'une quelconque des revendications 11 à 16 pour la modification ou la fusion de cellules.

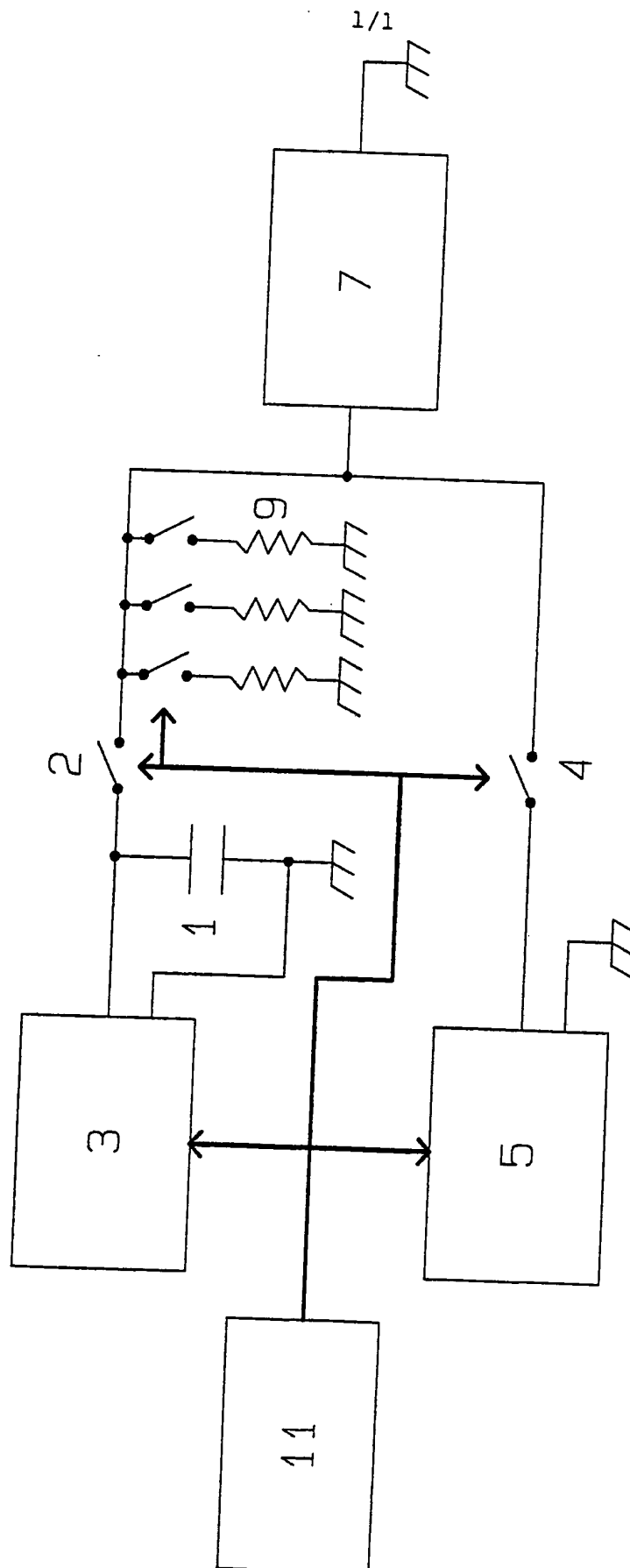


Fig. 1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/BE 91/00030

|  |   |                                     |
|--|---|-------------------------------------|
| <b>I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>   |   |                                     |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC<br>Int. Cl. <sup>5</sup> C 12 N 15/87      C 12 N 13/00  |   |                                     |
| <b>II. FIELDS SEARCHED</b>   |   |                                     |
| Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>  |   |                                     |
| Classification System  | Classification Symbols  |                                     |
| Int. Cl. <sup>5</sup>  | C 12 N  |                                     |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation<br>to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>  |   |                                     |
|  |   |                                     |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>   |   |                                     |
| Category <sup>9</sup>  | Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>  | Relevant to Claim No. <sup>13</sup> |
| X  | US, A, 4663292 (D.T. WONG, USA) 5 May 1987, see abstract, page 1, lines 36-46; page 2, lines 55-63; page 3, lines 1-17; page 5, lines 50-53; claims 1-2; figures 2, 3A, 3B                                      | 1-7, 9-14                           |
| Y  | US, A, 4910140 (BIO-RAD LABORATORIES INC.) 20 March 1990, see page 3, lines 60-68; page 4, lines 1-54; page 5, lines 19-61; page 7, lines 24-61; page 8, lines 7-32; page 10, lines 44-60; page 11, lines 11-36 | 1-7, 9-14                           |
| Y  | TRENDS IN BIOTECHNOLOGY; volume 6, No. 12, December 1988, Elsevier Publications, (Cambridge, GB), B.M. CHASSY et al.: "Transformation of bacteria by electroporation", pages 303-309, see the whole document    | 1-7, 9-14                           |
| ./.  |   |                                     |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div> |   |                                     |
| <b>IV. CERTIFICATION</b>   |   |                                     |
| Date of the Actual Completion of the International Search  | Date of Mailing of this International Search Report   |                                     |
| 9 August 1991 (09.08.91)   | 30 September 1991 (30.09.91)  |                                     |
| International Searching Authority  | Signature of Authorized Officer   |                                     |
| European Patent Office   |   |                                     |

| III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) |  |                      |
|--|--|----------------------|
| Category *   | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to Claim No |
| A  | WO, A, 8903426 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE, USA)<br>20 April 1989, see the whole document  | 1-19                 |
| A  | <p>---</p> <p>BIO/TECHNOLOGY, volume 7, October 1988, L.K. DUNICAN et al.: "High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation", pages 1067-1070, see the whole document</p> <p>-----</p> | 1-19                 |



**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

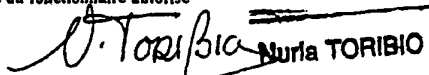
BE 9100030  
SA 47140

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 17/09/91  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US-A- 4663292                             | 05-05-87            | None                       |                     |
| US-A- 4910140                             | 20-03-90            | None                       |                     |
| WO-A- 8903426                             | 20-04-89            | US-A- 4822470              | 18-04-89            |
|   |                     | AU-A- 2787989              | 02-05-89            |
|   |                     | EP-A- 0386086              | 12-09-90            |
|   |                     | JP-T- 3502043              | 16-05-91            |
|   |                     | US-A- 4970154              | 13-11-90            |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internation. No PCT/BE 91/00030

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>   |   |   |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB<br>Int.C1.5                      C 12 N 15/87                      C 12 N 13/00  |   |   |
| <b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>  |   |   |
| Documentation minimale consultée <sup>8</sup>  |   |   |
| Système de classification  | Symboles de classification  |   |
| Int.C1.5   | C 12 N  |   |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>  |   |   |
|  |   |   |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>  |   |   |
| Catégorie <sup>o</sup>   | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>   | No. des revendications visées <sup>14</sup> |
| X  | US,A,4663292 (D.T. WONG, USA) 5 mai 1987, voir résumé, page 1, lignes 36-46; page 2, lignes 55-63; page 3, lignes 1-17; page 5, lignes 50-53; revendications 1-2; figures 2,3A,3B<br>---                                    | 1-7,9-14                                    |
| Y  | US,A,4910140 (BIO-RAD LABORATORIES INC.) 20 mars 1990, voir page 3, lignes 60-68; page 4, lignes 1-54; page 5, lignes 19-61; page 7, lignes 24-61; page 8, lignes 7-32; page 10, lignes 44-60; page 11, lignes 11-36<br>--- | 1-7,9-14                                    |
| Y  | TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 6, no. 12, décembre 1988, Elsevier Publications, (Cambridge, GB), B.M. CHASSY et al.: "Transformation of bacteria by electroporation", pages 303-309, voir le document en entier<br>---       | 1-7,9-14                                    |
| -/-  |   |   |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>o</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p><b>"A"</b> document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p><b>"E"</b> document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p><b>"L"</b> document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p><b>"O"</b> document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p><b>"P"</b> document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p><b>"T"</b> document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p><b>"X"</b> document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p><b>"Y"</b> document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p><b>"&amp;"</b> document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> |   |   |
| <b>IV. CERTIFICATION</b>   |   |   |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  |   |
| 09-08-1991   | 30. 09. 91  |   |
| Administration chargée de la recherche internationale  | Signature du fonctionnaire autorisé   |   |
| OFFICE EUROPEEN DES BREVETS  | <br>Nuria TORIBIO   |   |

| III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup> |  | (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA<br>DEUXIEME FEUILLE) |
|--|--|--|
| Catégorie °  | Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire<br>des passages pertinents <sup>17</sup>  | No. des revendications<br>visées <sup>18</sup>                 |
| A  | WO,A,8903426 (BAYLOR COLLEGE OF<br>MEDECINE, USA) 20 avril 1989, voir le document en<br>entier<br>----   | 1-19   |
| A  | BIO/TECHNOLOGY, vol. 7, octobre 1988, L.K.<br>DUNICAN et al.: "High frequency transformation of<br>whole cells of amino acid producing coryneform<br>bacteria using high voltage electroporation",<br>pages 1067-1070, voir le document en entier<br>----- | 1-19   |

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

BE 9100030  
SA 47140

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 17/09/91  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| US-A- 4663292                                   | 05-05-87               | Aucun                                   |                        |
| US-A- 4910140                                   | 20-03-90               | Aucun                                   |                        |
| WO-A- 8903426                                   | 20-04-89               | US-A- 4822470                           | 18-04-89               |
|   |                        | AU-A- 2787989                           | 02-05-89               |
|   |                        | EP-A- 0386086                           | 12-09-90               |
|   |                        | JP-T- 3502043                           | 16-05-91               |
|   |                        | US-A- 4970154                           | 13-11-90               |

ETO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82